昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，September 2007，50(9)：907 - 913　　ISSN 0454-6296

转双抗虫基因三倍体毛白杨外源基因表达及性状相关性分析

王　颖[1,2]，甄志先[1]，杨敏生[1,*]，李志兰[3]，梁海永[1]，阎海霞[1]

(1. 河北农业大学，河北保定　071000；2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所，海口　571101；3. 中国林业科学院亚热带林业研究所，浙江富阳　311400)

摘要：用部分改造的 Bt*Cry*1*Ac* 基因与慈菇蛋白酶抑制剂(*API*)基因构建的双抗虫基因表达载体，通过农杆菌介导法转化了三倍体毛白杨 *Populus tomentosa* Carr.，获得一批转双抗虫基因株系。对转基因株系的抗虫毒蛋白表达进行了 ELISA 和 Western Blot 检测，同时用转基因株系叶片对杨扇舟蛾 *Clostera anachoreta* Fabricius 和舞毒蛾 *Lymantria dispar* L. 幼虫进行室内饲虫试验，并对各项外源基因表达指标进行了相关分析。结果表明：在检测的 28 个转基因株系中，对杨扇舟蛾高抗株系占总参试系号的 41%，中抗系号占 35.0%，低抗系号占 24%，对舞毒蛾高抗株系占参试系号的 70%。转基因植株可明显抑制存活幼虫的生长发育，且不同转基因株系饲养的幼虫发育存在显著差异。连续两年相关分析表明，不同转基因株系幼虫死亡率间存在极显著相关。转基因植株对舞毒蛾和杨扇舟蛾均表达出抗虫性，并存在极显著相关。ELISA 检测结果表明，不同转基因株系 Bt 毒蛋白表达量存在差异，变化在 0.0011% ~ 0.0161%。转基因植株对害虫的杀虫效果与 Bt 杀虫蛋白的表达量存在显著相关，表明 Bt 毒蛋白在抗虫效果中占有重要地位。转基因植株对卡那霉素表现出一定的抗性，但与抗虫程度相关不明显，单纯用卡那霉素作为筛选手段并不能完全反映植株的真实抗虫效果。

关键词：三倍体毛白杨；转基因植株；外源基因；抗虫性

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)09-0907-07

Expression of exogenous gene and correlation analysis of characters of transgenic triploid of Chinese white poplar carrying two insect resistance genes

WANG Ying[1,2], ZHENG Zhi-Xian[1], YANG Min-Sheng[1,*], LI Zhi-Lan[3], LIANG Hai-Yong[1], YAN Hai-Xia
(1. Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China)

Abstract: Explants of the triploid of Chinese white poplar were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying the expression vector pBtiA containing two insect-resistant genes (Bt *Cry*1*Ac* gene and *API* gene). The expression of exogenous gene of transgenic subclones was analyzed by ELISA detection, Western blotting and laboratory bioassay with *Clostera anachoreta* Fabricius and *Lymantria dispar* L. The relationship among the characters of expression of exogenous gene was analyzed. The results showed that on average 41% of 28 transgenic subclones had a high insect resistance (larval mortality more than 80%) against *C. anachoreta*, 35% of them had middle insect resistance (larval mortality 40% - 80%) and 24% of them had a lower insect resistance (larval mortality lower than 40%). Also 70% of the transgenic subclones had a high insect resistance against *L. dispar*. Transgenic plant could obviously inhibit the growth and development of the larva, and the inhibition effect of the subclones was different. The expression of exogenous genes in transgenic

---

基金项目：国家林业局重点项目(2006-50)；河北省自然科学基金项目(006000464)

作者简介：王颖，女，1978 年生，河北石家庄人，硕士，助研，主要从事植物分子生物学研究，E-mail：wangyingem@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：deu100@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2007-03-19；接受日期 Accepted：2007-06-27

plant was stable. Correlation among larval mortalities of the transgenic subclones was significant in the two years tested. The transgenic plant showed insect resistance against *C. anachoreta* and *L. dispar*, and the resulted larval mortalities in the two insects were significantly correlated. ELISA detection indicated that the expression level of Bt toxoprotein in different subclones was varied in 0.0011% - 0.0161%. The obvious correlation between insect mortality and Bt toxoprotein content was proved. This suggested that Bt *Cry1Ac* gene plays an important role in insect resistance. The transgenic plant also showed some resistance against kanamycin. But the correlation between the resistances against insect and that against kanamycin was not significant. This suggested that selection only with kanamycin could not reflect the plant insect resistance exactly.

Key words: Triploid Chinese white poplar; transgenic plant; exogenous gene; insect resistance

杨树具有速生优质，轮伐期短，成材早、繁殖容易，用途广泛等特点，可作为速生丰产林、纸浆林等工业用材树种、防风固沙、农田防护林建设等生态林树种及城乡绿化树种使用，越来越引起人们的重视。我国杨树种植面积已超过 7×10^6 hm^2，是世界上杨树栽植面积最大的国家，已成为解决我国木材供应的一个重要用材树种，发挥了巨大的经济效益、生态效益和社会效益。但是，随着杨树人工造林面积的不断扩大，杨树的虫害问题越来越突出。以杨扇舟蛾、舞毒蛾、美国白蛾等为代表的鳞翅目害虫在我国杨树栽植区发生普遍，在部分地区猖獗成灾，危害严重，因此，培育抗虫杨树新品迫在眉睫。随着植物基因工程技术在植物品种改良上的应用，它作为一种育种手段已显示出巨大的潜力。目前应用基因工程技术转化杨树优良品种已取得很大的进展，国内外已有在杨树、落叶松、白云杉、枫香树转入抗虫基因的报道，特别是杨树转基因研究取得了较大进展(王谣等，1999；Tian *et al*.，2000；李志兰和杨敏生，2002)。三倍体毛白杨 *Populus tomentosa* 是我国目前应用广泛的纸浆林工业用材树种(朱之悌等，1995)，为提高其抗虫性，我们将部分改造的 Bt 基因和慈菇蛋白酶抑制剂(*API*)基因构建在一个植物表达载体上，通过农杆菌介导将此表达载体上的双基因转入三倍体毛白杨中，获得了一批转基因株系。

外源基因在转基因植株中的表达往往因多种因素而引起沉默(Matzke and Matzke，1998；Kumar and Fladung，2002；曾凡锁和詹亚光，2004)它是植物基因工程在应用中存在的 3 大问题(外源基因丢失、沉默及安全性)之一。本文对转基因杨树中杀虫毒蛋白的表达及其抗虫性进行了研究，旨在探索外源基因在转基因杨树无性系中的表达差异和稳定性，为选育出高效抗虫优良无性系提供依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料与测试昆虫

转基因三倍体毛白杨 28 个株系和未转基因三倍体毛白杨。转化的外源基因为部分改造的 Bt *Cry1Ac* 基因与慈菇蛋白酶抑制剂(*API*)基因，标记基因为新霉素磷酸转移酶基因(*npt* Ⅱ)。28 个转基因株系均经过 PCR 检测，并进行了 Southern blot 检测，证明外源基因已经整合到三倍体毛白杨基因组中(杨敏生等，2006)。

测试昆虫为人工饲养的舞毒蛾 *Lymantria dispar* L.和杨扇舟蛾 *Clostera anachoreta* Fabricius 幼虫。

1.2 实验方法

1.2.1 转基因株系抗虫性检测：杨扇舟蛾和舞毒蛾卵块分别孵化后，随机地从中挑选幼虫，用毛笔轻移到清洁干净的高 12 cm，直径 8.5 cm 的罐头瓶中，每瓶 30 头，放入新鲜的叶片，然后用带通气孔塑料薄膜扎紧瓶口。每 2 天换一次新鲜叶片，观察和记录幼虫的死亡和蜕皮情况。

1.2.2 不同转基因株系对幼虫发育的影响：在虫试的第 21 天，对各系号的幼虫体重、平均体长和虫粪进行称量。从初步虫试结果中选取高抗株系 No.6、No.5 和 No.47 作饲虫试验，以未转基因植株为对照。从 1 龄开始用各系号新鲜叶片饲养杨扇舟蛾幼虫，待幼虫长到 3 龄后，分瓶，每瓶 6 头幼虫，共设 5 次重复。

1.2.3 计算方法：总死亡率 = 饲养末期死亡总数/初期饲养总数 × 100%

食叶面积 = [原叶片面积 × (原叶片重 - 剩余叶片重)]/原叶片重

1.2.4 杀虫蛋白的表达测定：Bt 毒蛋白的 ELISA 检测：根据初步虫试筛选结果选出高抗株系 No.5、No.6、No.27，中抗株系 No.24、No.47，低抗株系 No.

9、No. 30，同时以未转基因植株为对照，采用美国 Agdia 公司提供的 Bt*Cry*1*Ab*/1*Ac* ELISA 试剂盒对各系号进行 Bt 毒蛋白的测定，测定方法参照 Tian 等(2000)进行。

Western blot 检测：随机选出 PCR 结果为阳性的 5 个转基因株系，进行 Western 杂交。测定方法参照陈颖等(1996)。

1.2.5　新霉素磷酸转移酶表达分析：随机选取高度和粗度基本一致的各系号组培苗茎段(3 株/瓶)接于附加 50 mg/L 卡那霉素的生根培养基中(1/2 MS + IBA 0.4 mg/L + 蔗糖 1.5% + 琼脂 6.5 g/L)，每个系号 2 个重复，每天观察记录各系号生根情况。

生根指数 = $\sum$(在时间 t 日的生根数/相应的生根日数)

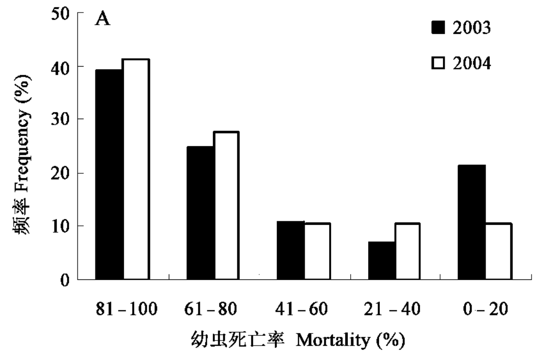
1.3　数据统计处理

试验数据用 Microsoft Excel 进行处理。

2　结果与分析

2.1　转基因株系对害虫的致死效应

连续 2 年用各转基因株系植株和 CK 的幼嫩叶片饲喂杨扇舟蛾和舞毒蛾幼虫，统计各系号植株的幼虫死亡率，28 个转基因株系幼虫死亡率频率分布列于图 1。



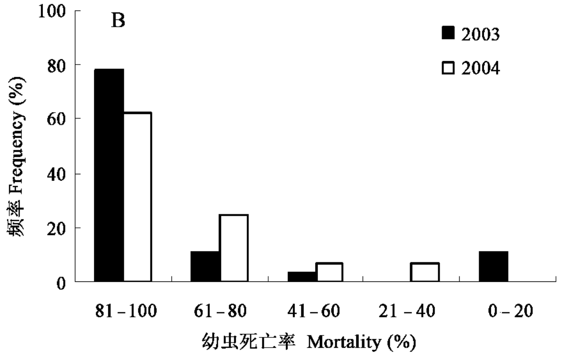


图 1　转基因株系对杨扇舟蛾幼虫(A)和舞毒蛾幼虫(B)的致死效应

Fig. 1　The lethal effect of transgenic subclones to *Clostera anachoreta* (A) and *Lymantria dispar* (B)

图 1 结果表明，不同转基因株系对两种害虫杀虫效果存在明显差异，2 年中平均有 41% 的转基因株系对杨扇舟蛾幼虫死亡率在 80% 以上，致死率在 40% ~ 80% 的转基因株系平均占 35%，致死率在 40%以下的平均占 24%。对舞毒蛾的致死率表现出相同的趋势，致死率占 80% 以上的转基因株系平均占 70%，致死率为 40% ~ 80% 的株系占 22%，致死率在 40%以下的株系占 8%。同时，未转基因对照幼虫死亡率极低，两种昆虫幼虫致死率均为 20% 以下，即用对照叶片饲养的杨扇舟蛾幼虫 2 年平均死亡率为 10.5%，舞毒蛾幼虫平均死亡率为 6.7%。

2.2　转基因株系对害虫发育的影响

2.2.1　对杨扇舟蛾幼虫发育的影响：转基因植株对杨扇舟蛾具有较强的致死效应，但不能将害虫完全杀死。在饲养过程中，除死亡的昆虫外，还存活一定数量的昆虫，但其生长发育受到严重影响，表 1 中列出了用转基因叶片饲养 21 天时，幼虫发育相关指标统计结果。

从表 1 中可以看出，不同转基因株系饲养的幼虫发育存在显著差异，变异系数均较大，其中，虫重、食叶面积和食叶量的变异系数最大，而体长和虫粪重的变异系数较小。说明幼虫取食转基因植株叶片一段时间以后，由于各系号抗性程度不同，虫体重和取食量发生了很大的变化。

表 1　转基因株系对杨扇舟蛾幼虫发育的影响

Table 1　The effect of feeding transgenic subclones on larval development of *Clostera anachoreta*

发育指标 Development index	样本数 Sample number	平均值 ± 标准差 Mean ± *SD*	变异系数（%） Coefficient of variation
虫重（mg） Body weight	23	66.3 ± 67.8	102.3
平均体长（mm） Body length	23	15.2 ± 8.4	55.3
虫粪重（mg/body） Frass weight	23	26.1 ± 8.4	32.2
食叶重（mg/body·day） Leaf weight eaten	7	65.7 ± 84.6	128.8
食叶面积（cm^2/body·day） Leaf area eaten	7	3.4 ± 4.7	138.2

2.2.2　对杨扇舟蛾幼虫生长发育的抑制作用：从体重增长情况来看，用转基因植株叶片饲养的幼虫

体重增长量明显低于对照(图 2)。在第 7 天时,转基因株系 No.6、No.5、No.47 饲养的幼虫体重远远低于对照,第 9 天时,No.5、No.47 饲养的幼虫全部死亡。6 号饲养的幼虫在第 13 天时也全部死亡。而对照饲养的幼虫体重一直在上升。

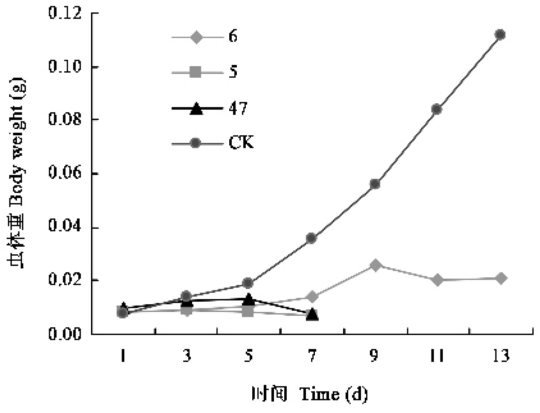


图 2 杨扇舟蛾幼虫每 2 天的虫体重
Fig. 2 Change of the average body weight of *Clostera anachoreta* in every 2 days

转基因植株不仅对幼虫的体重有影响,而且对其排粪量也有一定影响。从图 3 可以看出,取食对照的幼虫排粪量最多,且排粪量随天数的增加而增加;取食转基因株系 No.5、No.47 的幼虫排粪量在第 7 天时达到最低。取食 No.6 的幼虫排粪量在第 9 天以后逐渐减少,到第 13 天时排粪量最低。排粪量的减少,说明取食量的减少或消化不良,且取食转基因植株的幼虫在后期排粪不呈粒状,与对照饲养幼虫排粪相比较潮湿。

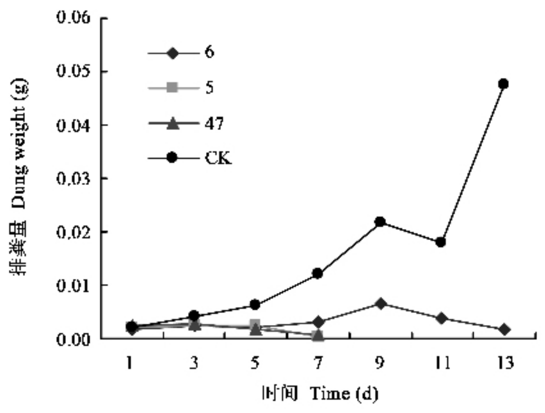


图 3 杨扇舟蛾每 2 天的排粪量
Fig. 3 Change of the average dung weight of *Clostera anachoreta* in every 2 days

2.3 杀虫蛋白表达分析

2.3.1 Bt 毒蛋白的 ELISA 检测:根据所得 Bt 毒蛋白浓度和总蛋白含量,计算出各系号的毒蛋白表达量。表 2 结果表明,不同转基因株系 Bt 毒蛋白表达量存在差异,No.27 具有较高的 Bt 毒蛋白表达量,为 0.0161%;No.24、No.6、No.47 和 No.5 的毒蛋白表达量在 0.0055% ~ 0.0133%之间;No.9 和 No.30 的毒蛋白表达量较低分别为 0.0015%和 0.0011%;对照未转基因植株毒蛋白表达量 0.0006%。通过初步虫试结果可知,转基因株系 No.27、No.24、No.6、No.47、No.5 均具有较强的抗虫性。

表 2 转基因三倍体毛白杨的 Bt 毒蛋白表达量
Table 2 The expression level of Bt toxoprotein in transgenic triploid hybrid of Chinese white poplar

系号 Subclone no.	Bt 毒蛋白浓度 Bt toxoprotein concentration (ng/100 μL)	总蛋白浓度 Total protein concentration (μg/100 μL)	Bt 毒蛋白/总蛋白 Bt toxoprotein/ Total protein (%)
27	26.99	167.17	0.0161
24	24.10	181.47	0.0133
6	23.07	181.62	0.0127
47	18.68	188.87	0.0099
5	9.80	179.17	0.0055
9	2.17	147.92	0.0015
30	1.98	174.92	0.0011
CK	1.05	181.47	0.0006

2.3.2 慈菇蛋白酶抑制剂(*API*)基因的 Western Blot 检测:从 PCR 结果为阳性的转基因株系中随机抽出 5 个系号进行 Western 杂交检测。检测结果如图 4 所示。从图 4 中看出,标准蛋白在 17 kD 处有一条特异带,而未转基因对照的蛋白条带中则没有这条带。转基因三倍体毛白杨 No.6 的表达产物正好与对照标准蛋白的表达产物分子量一致,在 17 kD 处同样有一条特异带。慈菇蛋白酶抑制剂是由 475 个碱基编码的,由已知序列推知其含 158 个氨基酸残基,分子量恰好在 17 kD 左右,确定转基因植株 No.6 所表达的蛋白为慈菇蛋白酶抑制剂蛋白,证明了转基因的成功。

2.4 新霉素磷酸转移酶基因表达分析

外源基因转入三倍体毛白杨中,作为选择标记基因新霉素磷酸转移酶基因(*npt* Ⅱ)同时插入受体植物基因组中,并得到表达。对 *npt* Ⅱ 基因的表达情况进行分析,可进一步了解外源基因的表达规律。在转化植株筛选和培养中,在选择培养基中添加 50 mg/L 卡那霉素既可以有效的抑制假阳性愈伤组织的诱导,并不会对转化植株叶肉组织产生毒害影响。生根过程对卡那霉素的反应最敏感,生根的速度可有效反映 *npt* Ⅱ 基因表达的差异。

选取转基因三倍体毛白杨 7 个系号,取生长基本一致的各系号转基因组培苗,分别接入含有 50

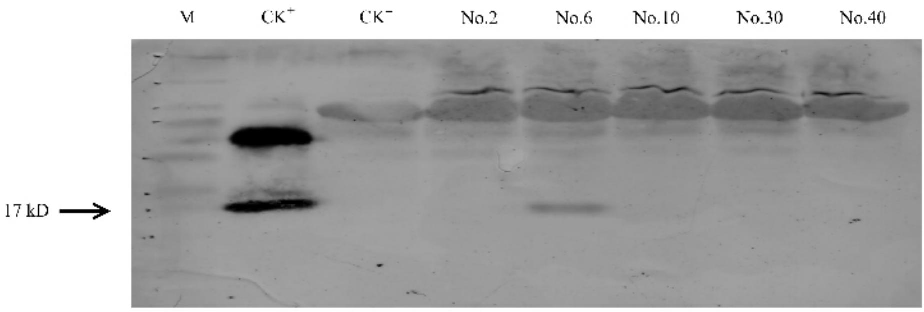


图 4　Western 杂交检测慈菇蛋白酶抑制剂表达结果

Fig. 4　Western blot test for the expression of *API*

M：标准分子量 Marker；泳道 1 Lane 1：阳性对照 CK^{+} Positive control；泳道 2 Lane 2：阴性对照 CK^{-} Negative control；泳道 3～7 Lane 3－7：转基因株系 Transgenic plants.

mg/L 卡那霉素的生根培养基中，7 天后观察并记录不定根的数量及根的动态变化情况，结果列于表 3。

由表 3 可以看出，未转基因对照接入含 50 mg/L 卡那霉素的生根培养基，10 天后观察，其根部已呈黑色，植株上部叶片黄化，呈现卡那霉素受害症状，而转基因各系号植株全部生根，说明由于外源基因的插入，新霉素磷酸转移酶（*npt* Ⅱ）基因已整合到各株系植株中，从而表现出对卡那霉素的抗性。不同转基因株系生根率和生根速度存在差异，其中 No.30、No.6、No.47、No.41、No.26 的生根率较高，在 75%～100%之间，No.30、No.27、No.24 和 No.6 的生根速率较快，生根指数较高。表明不同转基因株系中 *npt* Ⅱ 基因的表达存在差异。

表 3　不同转基因株系在附加卡那霉素培养基上生根情况

Table 3　The rootage data of different subclones cultivated on the medium added kanamycin

系号 Subclone no.	总株数 Number of plants	第 6 天 Day 6		第 7 天 Day 7		第 8 天 Day 8		第 9 天 Day 9		第 10 天 Day 10		生根指数 Rootage index
		累积生根株数 Root number	平均根长 Root length (mm)	累积生根株数 Root number	平均根长 Root length (mm)	累积生根株数 Root number	平均根长 Root length (mm)	累积生根株数 Root number	平均根长 Root length (mm)	累积生根株数 Root number	平均根长 Root length (mm)	
30	31	0	0	16	3	25	8	26	10	27	15	28.2
27	31	0	0	10	3	15	8	19	10	19	18	18.6
24	20	1	2	7	5	15	10	15	10	15	30	16.3
6	9	1	2	3	6	8	10	8	15	9	20	12.3
47	9	0	0	4	5	4	5	5	10	8	20	6.2
41	9	1	1	2	3	3	6	6	10	7	16	5.9
26	9	0	0	2	2	3	4	5	8	8	14	4.9

2.5　转基因三倍体毛白杨外源基因表达规律及相互关系分析

不同转基因株系中，外源基因的表达存在差异，从而导致毒蛋白表达量不同，对不同害虫的致死效应不同，在不同年份表达效果也不相同。分析各项检测指标间的相关性，对于深入了解外源基因表达规律和进一步的抗虫筛选具有重要意义。

2.5.1　不同年份间幼虫死亡率的相关分析：2003 年和 2004 年连续两年用不同转基因株系叶片饲养杨扇舟蛾和舞毒蛾，两年的幼虫死亡率变化基本一致。对两年的幼虫死亡率进行相关性分析表明（表 4），各株系对杨扇舟蛾幼虫在两年间的致死率相关系数为 0.885，达到极显著相关；对舞毒蛾幼虫的致死率相关系数为 0.863，达到极显著相关。说明转基因株系在两年间抗虫性表达上比较稳定。

2.5.2　不同虫种间幼虫死亡率相关分析：由饲养统计结果发现（图 1 和表 4），转基因植株对杨扇舟蛾和舞毒蛾的致死率存在差异，但各株系对两种害虫的抗虫效果表现一致。对两种幼虫死亡率进行相关性比较表明，2003 年和 2004 年杨扇舟蛾和舞毒蛾的幼虫死亡率相关系数分别为 0.844 和 0.780，均达到极显著相关。杨扇舟蛾和舞毒蛾幼虫死亡率在不同年份间相关系数为 0.841 和 0.827，也达到了极显著相关。说明转基因植株对杨扇舟蛾和舞毒蛾的虫试结果高度一致，虫试筛选结果比较准确可靠。

2.5.3　幼虫死亡率与 Bt 毒蛋白表达量间相关性分

表 4　各转基因株系对杨扇舟蛾和舞毒蛾幼虫的致死率在两年间的相关系数

Table 4　Correlation coefficient among larval mortalities of *Clostera anachoreta* and *Lymantria dispar* feeding on transgenic subclones in two years

		2003		2004	
		杨扇舟蛾 *C. anachoreta*	舞毒蛾 *L. dispar*	杨扇舟蛾 *C. anachoreta*	舞毒蛾 *L. dispar*
2003	杨扇舟蛾 *C. anachoreta*	1.000	0.844**	0.885**	0.841**
	舞毒蛾 *L. dispar*		1.000	0.827**	0.863**
2004	杨扇舟蛾 *C. anachoreta*			1.000	0.780**
	舞毒蛾 *L. dispar*				1.000

注：**示达极显著水平相关（$P = 0.01$）。Notes：** means significant correlation（$P = 0.01$）.

析：根据表 2 和图 1 数据，对杨扇舟蛾死亡率与 Bt 毒蛋白表达量进行了相关性分析。转基因植株对杨扇舟蛾的毒杀结果与 ELISA 检测的 Bt 毒蛋白表达量相关系数为 $r = 0.827$，在 $\alpha = 0.05$（$r_\alpha = 0.7067$，$n = 8$）水平上相关性显著。表明室内饲虫结果与 ELISA 试剂盒检测结果一致。即毒蛋白表达量越高，杨扇舟蛾幼虫死亡率越高；反之，杨扇舟蛾幼虫死亡率越低。说明两种检测方法都比较可靠，同时也说明 Bt 毒蛋白在抗虫效果中占有重要地位，两种方法结合，可以准确、快速地对大量转化植株进行初步筛选。

2.5.4　抗虫性与抗卡那霉素能力之间的相关分析： 根据图 1 和表 3 结果，将杨扇舟蛾死亡率与含卡那霉素培养基上苗木生根速度指标进行相关性分析。结果表明，转基因植株幼虫死亡率与组培苗生根指数的相关系数为 $r = 0.590$，在 $\alpha = 0.05$（$r_\alpha = 0.7545$，$n = 7$）水平上相关性不显著，说明抗虫基因的表达和 *npt* Ⅱ 基因的表达相关性不明显，当用卡那霉素对组培苗进行筛选时，并不是生根指数越高抗虫性越高。

但从表 3 中可以看出，高抗株系 No.27、No.6 饲养的杨扇舟蛾死亡率为 100%，生根指数较高，达到 18.6 和 12.2，说明 No.27、No.6 的 *npt* Ⅱ 基因和 Bt-*API* 基因表达较一致。低抗系号 No.30、No.24 饲养的杨扇舟蛾死亡率在 60% 以下，但生根指数却在 15.0 以上。说明转基因植株体内整合的 Bt-*API* 基因和 *npt* Ⅱ 基因可能由于某种原因表达有强有弱，从而使得 *npt* Ⅱ 基因和 Bt-*API* 基因表达不一致。这一结果含有待于进一步验证。

3　讨论

研究外源基因在转基因植株中的表达行为，是筛选具高抗虫性株系进行抗虫育种的必要环节。许多研究表明，不是所有的转基因株系对目标害虫均能表现出高的抗虫性。田颖川等（1993）用含 Bt 基因的农杆菌 LBA4404 转化欧洲黑杨，共获得 54 株转基因植株。15% 的转基因植株对杨尺蠖的校正死亡率为 80% ~ 96%，部分植株对舞毒蛾 5 ~ 9 天内的校正死亡率高达 100%。本研究用不同系号的转基因植株叶片饲养杨扇舟蛾和舞毒蛾幼虫，杨扇舟蛾高抗系号所占比例占总参试系号的 41%，中抗系号所占比例略高于低抗系号，占 35%，低抗系号占总参试系号的 24%。对舞毒蛾的抗性也表现出相似的趋势，但高抗系号所占比例提高，达到 70%。

外源抗虫基因在转基因植物中的表达能力，决定了其杀虫效果。准确分析外源基因毒蛋白表达量，对于准确鉴定和筛选高抗虫性转基因株系是非常重要的。从 Bt 制剂杀虫晶体蛋白的免疫检测基础上发展起来的酶联免疫法（ELISA）是较为成熟的 Bt 毒蛋白检测方法。许多研究证明，不同转基因株系毒蛋白表达量存在差异。林良斌等（2001）采用 ELISA 方法检测 Bt 杀虫基因在转基因油菜植株中的表达发现，在第 3 至第 9 叶期 Bt 杀虫蛋白基因在转基因油菜植株中稳定、高效地表达，Bt 杀虫蛋白的表达量为 170 ng/25 mg ~ 260 ng/25 mg 鲜叶，占植物可溶性蛋白的 0.067% ~ 0.105%，其抗虫效果高达 42.5% ~ 80.0%。Tian 等（2000）用 ELISA 方法对转双抗虫基因（Bt 和 *API* 基因）741 杨 Bt 毒蛋白检测结果表明，3 株转基因杨树都有 Bt 杀虫蛋白的表达，表达量约占叶总可溶性蛋白的 0.015%，和我们的测定结果一致。上述 ELISA 测定法，都有生物测定数据的验证，即毒蛋白表达量高，抗虫性强。

从 PCR 结果为阳性的转基因株系中随机抽出 5 个系号进行 Western 杂交检测。有一个株系检测到表达蛋白酶抑制剂蛋白，证明转基因成功并正常表达。其他系号并未检测到毒蛋白，这也并不能说明在这些系号中 *API* 基因未表达。Western Blot 法是最早用于检测植物毒蛋白含量分析的方法，但检测

灵敏度不高，低于 10 ng/mg 可溶性蛋白，就很难检测出来。

研究 *npt* Ⅱ 基因和抗虫基因表达的关系，对于了解外源基因表达规律，准确筛选抗虫转化植株，具有重要意义。*npt* Ⅱ 基因作为选择标记基因在转化植株筛选中起着关键作用。外源基因插入植株基因组中，并表达出新霉素磷酸转移酶，使得转化植株具备抗卡那霉素的能力，从而可以通过含有卡那霉素的培养基进行转化植株的初步筛选。生根过程对卡那霉素的反应最敏感，生根的速度可有效反映 *npt* Ⅱ 基因表达的强度。本研究用 50 mg/L 卡那霉素对转基因三倍体毛白杨的组培苗生根能力进行了筛选。与转基因植株抗虫性比较发现，生根指数大的抗虫性不一定好，表明 Bt-*API* 基因和 *npt* Ⅱ 基因的表达可能不一致。说明转基因植株对卡那霉素表现出一定的抗性，但抗虫程度却有差别。转基因的目的是希望筛选出抗虫性好的株系，单纯用卡那霉素作为鉴定手段并不能反映单株的真实抗虫性（Kooter *et al*.，1999；施荣华和李学宝，2000；杨朋波等，2003）。因此，卡那霉素作为转基因组培苗的筛选手段是很有效的，但与最终的抗虫性结果相关性不显著，这需要进一步的试验论证。

对外源基因表达相关分析表明，不同转基因株系抗虫性不同，连续两年相关分析表明，幼虫死亡率间存在极显著相关，说明转基因植株抗虫性表达比较稳定。转基因植株对两种重要的鳞翅目害虫舞毒蛾和杨扇舟蛾均表达出抗虫性，且对这两种害虫抗虫性存在极显著相关，证明转基因植株对鳞翅目害虫具有广谱性杀虫效果。转基因植株对害虫的杀虫效果与 Bt 杀虫蛋白的表达量存在显著相关，说明 Bt 毒蛋白在抗虫效果中占有重要地位。转基因植株抗虫性与另一个抗虫基因 *API* 基因的关系，还有待于进一步研究。

参 考 文 献（References）

Chen Y，Li Q，Li L，Han YF，Tian YC，1996. Western blot analysis of transgenic *Populus nigra* plants transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin gene. *Scientia Silvae Sinicae*，32(3)：274 – 276.［陈颖，李强，李玲，韩一凡，田颖川，1996. 抗虫转基因欧洲黑杨的 Western 印迹法分析. 林业科学，32(3)：274 – 276］

Kooter JM，Matzke MA，Meyer P，1999. Listening to the silent genes：transgene silencing，gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci*.，4：340 – 347.

Kumar S，Fladung M，2002. Transgene integration in aspen：structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J*.，31：543 – 551.

Li ZL，Yang MS，2002. Advances on genetic engineering breeding of poplar. *Journal of Agricultural University of Hebei*，25(Suppl.)：145 – 158.［李志兰，杨敏生，2002. 杨树基因工程育种研究进展. 河北农业大学学报，25(增刊)：145 – 158］

Lin LB，Guan CY，Yang HW，Li YZ，Yang ZX，2001. Dynamics of expression of Bt insecticidal protein gene in the transgenic rapeseed and its insect-resistance activity. *Journal of Southwest Agricultural University*，23(2)：100 – 107.［林良斌，官春云，杨焕文，李永忠，杨志新，2001. Bt 杀虫蛋白基因在转基因油菜中的动态表达与其抗虫性研究. 西南农业大学学报，23(2)：100 – 107］

Matzke AJM，Matzke MA，1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol*.，1：142 – 148.

Shi RH，Li XB，2000. Expression and inheritance of transgenes in the transgenic oilseed rape progeny. *Journal of Central China Normal University*，34(2)：208 – 212.［施荣华，李学宝，2000. 外源基因在转基因油菜后代中的表达及遗传学分析. 华中师范大学学报，34(2)：208 – 212］

Tian YC，Li TY，Mang KQ，Han YF，Li L，Wang XP，Lu MZ，Dai LY，Han YN，Yan JJ，1993. Studies on transgenic *Populus nigra* plants transformed insect-risistant genes. *Chinese Journal of Biotechnology*，9(4)：291 – 297.［田颖川，李太元，莽克强，韩一凡，李玲，王学聘，卢孟柱，戴连韵，韩一侬，严静君，1993. 转抗虫基因欧洲黑杨的培育. 生物工程学报，9(4)：291 – 297］

Tian YC，Zheng JB，Yu HM，Liang HY，Li CQ，Wang JM，2000. Studies of transgenic hybrid poplar 741 carrying two insect resistant genes. *Acta Botanica Sinica*，42(3)：263 – 268.

Wang Y，Lin ML，Shen XH，Liu S，1999. Xylophyta genetic transformation by *Agrobacterium*. *Biotechnology Bulletin*，6：23 – 27.［王瑶，林木兰，沈锡辉，柳晟，1999. 农杆菌介导的木本植物遗传转化. 生物技术通报，6：23 – 27］

Yang PB，Cao ML，Yang LL，Liu HM，Wang JJ，Zhang WY，2003. Comparative analysis on Kanamycin resistance and boll worm-resistance of transgenic Bt cotton. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*，31(2)：30 – 32.［杨朋波，曹美莲，杨六六，刘惠民，王娇娟，张武云，2003. 转 Bt 基因棉抗卡那霉素与抗虫性比较分析. 山西农业科学，31(2)：30 – 32］

Yang MS，Li ZL，Wang Y，Wang JM，Liang HY，2006. Transformation and expression of two insect-resistant genes to hybrid triploid of Chinese white poplar. *Scientia Silvae Sinicae*，42(9)：61 – 68.［杨敏生，李志兰，王颖，王进茂，梁海永，2006. 双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达. 林业科学，42(9)：61 – 68］

Zeng FS，Zhan YG，2004. Integration of exogenous genes in transgenic plant genomes：characteristics and approaches. *Chinese Bulletin of Botany*，21(5)：565 – 577.［曾凡锁，詹亚光，2004. 转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略. 植物学通报，21(5)：565 – 577］

Zhu ZT，Lin HB，Kang XY，1995. Studies on allotriploid breeding of populus tomentosa B301 clones. *Scientia Silvae Sinicae*，31(6)：499 – 505.［朱之悌，林惠斌，康向阳，1995. 毛白杨异源三倍体 B301 等无性系选育的研究. 林业科学，31(6)：499 – 505］

（责任编辑：袁德成）